

POWERED BY **Dialog**

15

Treatment or prevention of cardiac insufficiency and related conditions, e.g. pulmonary congestion and dyspnoea, comprises administration of heparanase inhibitor

Patent Assignee: KNOLL AG; ABBOTT GMBH & CO KG

Inventors: HAHN A; HERR D; LAUX V

Patent Family

Patent Number	Kind	Date	Application Number	Kind	Date	Week	Type
DE 19955803	A1	20010523	DE 1055803	A	19991119	200139	B
WO 200135967	A1	20010525	WO 2000EP11441	A	20001117	200139	
AU 200115221	A	20010530	AU 200115221	A	20001117	200152	
EP 1229921	A1	20020814	EP 2000977548	A	20001117	200261	
			WO 2000EP11441	A	20001117		

Priority Applications (Number Kind Date): DE 1055803 A (19991119)

Patent Details

Patent	Kind	Language	Page	Main IPC	Filing Notes
DE 19955803	A1		16	A61K-045/00	
WO 200135967	A1	G		A61K-031/715	
Designated States (National): AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY CA CH CN CR CU CZ DE DK DM DZ EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX NO NZ PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TR TT TZ UA UG US UZ VN YU ZA ZW					
Designated States (Regional): AT BE CH CY DE DK EA ES FI FR GB GH GM GR IE IT KE LS LU MC MW MZ NL OA PT SD SE SL SZ TR TZ UG ZW					
AU 200115221	A			A61K-031/715	Based on patent WO 200135967
EP 1229921	A1	G		A61K-031/715	Based on patent WO 200135967
Designated States (Regional): AL AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LT LU LV MC MK NL PT RO SE SI TR					

Abstract:

DE 19955803 A1

NOVELTY Heparanase inhibitors are used for the treatment or prevention of cardiac insufficiency and associated indications, symptoms and/or malfunctions.

ACTIVITY Cardiant; nephrotropic; hepatotropic. Tests for heparanase expression were carried out in a

rat model for cardiac insufficiency described in Circulation 95, 1253-1259 (1997). Congestive cardiac insufficiency was induced in 5 rats, the hearts were removed, the mRNA was isolated and the amount of expressed heparanase mRNA was determined. Average mRNA expression (excluding standard deviation) in these rats was 4.153 compared with 4.289, indicating that the induced pathological state was not associated with a regulation of heparanase mRNA expression. The intra- and extra-cellular increase in heparanase activity is seen in cardiac hypertrophy and insufficiency.

MECHANISM OF ACTION Heparanase inhibitor.

USE The method can be used in human and veterinary medicine, for the treatment or prevention of congestive heart failure e.g. primary cardiomyopathy. Associated conditions treated or prevented with the inhibitor are especially peripheral odemas, pulmonary and hepatic congestion, dyspnoea, hydrothorax and ascites. Renal problems, e.g. nocturia can also be treated.

pp; 16 DwgNo 0/1

Technology Focus:

TECHNOLOGY FOCUS - PHARMACEUTICALS - Preferred Inhibitor: The heparin inhibitor is a glycosaminoglycan, especially:

- (a) a heparin which has partly reduced COOH groups, or is at least partly N-desulfated and N-acetylated or is at least partly N,O-desulfated and N-resulfated or is O-acylated;
- (b) a sulfated and/or phosphorylated oligosaccharide;
- (c) a glycomimetic saccharopeptide;
- (d) a laminarin sulfate;
- (e) suramin; or
- (f) trachyspinic acid.

Alternatively, the inhibitor can be a low molecular weight compound.

Derwent World Patents Index

© 2005 Derwent Information Ltd. All rights reserved.

Dialog® File Number 351 Accession Number 13884158



⑮ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 199 55 803 A 1**

⑤ Int. Cl.⁷:
A 61 K 45/00
A 61 K 31/727
A 61 P 9/10

⑲ Aktenzeichen: 199 55 803.5
⑳ Anmeldetag: 19. 11. 1999
㉓ Offenlegungstag: 23. 5. 2001

DE 199 55 803 A 1

⑦① Anmelder:
Knoll AG, 67061 Ludwigshafen, DE

⑦④ Vertreter:
Kinzebach, W., Dipl.-Chem. Dr.phil., Pat.-Anw.,
67059 Ludwigshafen

⑦② Erfinder:
Herr, Dieter, Dr., 67122 Altrip, DE; Hahn, Alfred, Prof.
Dr., 68199 Mannheim, DE; Laux, Volker, Dr., 55128
Mainz, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑤④ Verwendung von Heparanase-Inhibitoren zur Behandlung von Hersinsuffizienz

⑤⑦ Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Heparanase-Inhibitoren zur Behandlung von Herzinsuffizienz, insbesondere kongestiver Herzinsuffizienz, und damit zusammenhängenden Anzeichen, Symptomen und/oder Fehlfunktionen, wie peripheren Ödemen, Lungen- und Leberkongestion, Dyspnoe, Brust- und Bauchwassersucht.

DE 199 55 803 A 1

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung wenigstens eines Heparanase-Inhibitors zur Behandlung von Herzinsuffizienz und damit zusammenhängenden Anzeichen, Symptomen und/oder Fehlfunktionen.

- 5 Proteoglykane sind polyanionische Substanzen hohen Molekulargewichts, in denen verschiedene Arten von Heteropolysaccharid-Ketten kovalent an ein Polypeptidrückgrat gebunden sind. Die ehemals als Mucopolysaccharide bezeichneten Polysaccharidgruppen der Proteoglykane werden neuerdings als Glycosaminoglykane bezeichnet. Eine Vielzahl von Enzymen ist an dem Auf-, Um- und Abbau dieser Proteoglykane beteiligt. Durch Proteolyse können Glycosaminoglykane freigesetzt werden, die wiederum unter der Einwirkung von Glycosaminoglykan-Endoglycosidasen in kleinere
10 Fragmente zerlegt werden, während entsprechende Exoglycosidasen Monosaccharide von den nicht-reduzierenden Enden der Glycosaminoglykane freisetzen.

- Heparansulfat (HS) und Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG) kommen auf der extrazellulären Oberfläche und in der extrazellulären Matrix vor. Die HS-Ketten werden im allgemeinen aus Clustern sulfatierter Disaccharid-Einheiten, vornehmlich 1-4 an α -Iduronsäure-Reste gebundenes N-sulfatiertes Glucosamin, gebildet, die durch wenig oder nicht sulfatierte Regionen, vornehmlich 1-4 an β -D-Glucuronsäure gebundenes N-acetyliertes Glucosamin, voneinander getrennt sind. Ihnen wird eine Hauptrolle in Zell-Zell- und Zell-Matrix-Wechselwirkungen zugeschrieben, die an verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen beteiligt sind. Zu nennen sind hier beispielsweise die Adhäsion, Migration, Differenzierung und Proliferierung von Zellen. Berichten zufolge interagieren verschiedene Moleküle mit HS und/oder HSPG. Es handelt sich dabei entweder um Wachstumsfaktoren (z. B. FGF, PDGF, VEGF), Cytokine (IL-2), extrazelluläre Matrixproteine (Fibronektin, Collagen), an der Hämostase beteiligte Faktoren (Heparin-Cofaktor II), oder um Moleküle anderer Natur, z. B. Lipoproteine, DNA-Topoisomerasen und β -Amyloidproteine (vgl. Hileman et al. (1998) *BioEssays* 20, 156-167; Stringer and Gallagher (1997) *Int. J. Biochem Cell Biol* 29, 709-714; Rapraeger (1993) *Curr. Opin. Cell. Biol.* 5, 844-853; Bernfield et al. (1993) *Development* 1993 Suppl. 205-212; Kjellen and Lindahl. (1991) *Annu. Rev. Biochem.* 60, 443-475; Schlessinger et al. (1995), *Cell* 83, 367-360; Turnbull und Gallagher (1993) *Biochem. Soc. Trans.* 21, 477-482; Najjam et al (1997) *Cytokine* 9, 1013-1022; Ho et al. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 16838-16844; Pillarisetti et al (1997) *J. Biol.*
20 *Chem.* 272, 15753-15759; Kovalszky et al. (1998) *Mol. Cell. Biol.* 183, 11-23; Schulz et al. (1998) *Eur. J. Neuroscience* 10, 2085-2093).

- Angesichts dieser vielfältigen Beteiligung ist HS/HSPG-modulierenden Enzymen besonderes Interesse entgegengebracht worden (Ernst et al. (1995) *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30, 387-444).

- Endoglycosidasen und insbesondere endo- β -Glucuronidase (im folgenden Heparanase genannt) fanden Beachtung, da sie mit der Metastasierung von Tumoren, entzündlichen Prozessen und der Leukozytenwanderung in Verbindung gebracht wurden (Vlodavsky et al. (1999) *Genbank Accession Nr.* AF 144325; Hulett et al. (1999) *Nature Medicine* 5, 803-809; Toyoshima and Nakajima (1999) *J. Bio. Chem* 274, 24153-24160). Tatsächlich wurde Heparanase ursprünglich in murinen metastatischen Melanomzellen entdeckt. Heparanase spaltet HS in charakteristische Fragmente hohen Molekulargewichts und diese Aktivität wurde mit dem metastatischen Potential der Melanomzellen korreliert (Nakajima et al. (1983) *Science* 220, 601-613; Nakajima et al. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 2283-2290). Infolge wurde eine erhöhte Heparanase-Aktivität in weiteren mobilen, invasiven Zellen aufgezeigt, beispielsweise in Zusammenhang mit Lymphomen, Mastocyten, Adenocarcinomen, Leukämien und rheumatoiden Fibroblasten.

- Gestützt auf diese Beobachtungen schlug man vor, Heparanase-Inhibitoren zu verwenden, um das invasive Potential von Zellen in Zusammenhang mit pathologischen Zuständen günstig zu beeinflussen. In diesem Sinne wird in der WO 99/43 830 vermutet, daß Inhibitoren der Heparanase-Aktivität auch bei der Behandlung von Arthritis, Asthma und anderen entzündlichen Erkrankungen, vaskulärer Restenose, Atherosklerose, Tumorstadium und -progression und fibroproliferativen Erkrankungen von Nutzen sein könnten, denn all diesen Zuständen liegt eine Einwanderung von
40 Fremdzellen in das betroffene Gewebe bzw. Organ zugrunde.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, neue therapeutische Anwendungen für eine Modulation der Heparanase-Aktivität bereitzustellen.

Überraschenderweise wurde nun gefunden, daß die Inhibition der Heparanase-Aktivität eine Behandlung von Herzinsuffizienz ermöglicht.

- 50 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung wenigstens eines Heparanase-Inhibitors zur Behandlung von Herzinsuffizienz.

- Unter Herzinsuffizienz (synonym: Myocardinsuffizienz, Herzmuskelschwäche, Insuffizienz cordis) versteht man erfindungsgemäß ein Unvermögen des Herzens, die erforderliche Förderleistung zu erbringen. Der Begriff Herzinsuffizienz beschreibt den Zustand eines Herzes, in dem Kompensationsmechanismen wie Herzfrequenz, Kontraktivität, Schlagvolumen, Hypertonie, nicht zur Aufrechterhaltung eines normalen Herzzeitvolumens ausreichen. Es handelt sich um eine Schwäche der Pumpenfunktion.

- Dieser Zustand kann bei Belastung (Belastungsinsuffizienz) oder schon in Ruhe (Ruheinsuffizienz) auftreten. Je nach Schweregrad wird gemäß der New York Heart Association (NYHA) unterschieden zwischen Funktionsklassen I bis IV, d. h. einer völligen Beschwerdefreiheit bei normaler körperlicher Belastung bis hin zu Insuffizienzzeichen bei jeder körperlichen Tätigkeit, die häufig auch in Ruhe bestehen.

- 60 Die Herzinsuffizienz kann das gesamte Herz (globale Herzinsuffizienz) oder Teile davon betreffen, beispielsweise Links- oder Rechtsherzinsuffizienz.

- Erfindungsgemäß bevorzugt ist die Behandlung von Myokardinsuffizienzen, d. h. Herzinsuffizienzen, die auf eine Veränderung des Myokards zurückzuführen sind. Zu nennen sind in diesem Zusammenhang insbesondere Kardiomyopathien und vorzugsweise primäre Kardiomyopathien, beispielsweise durch Hypertrophie des Herzens, vor allem des Kammerseptums und des linken Ventrikels gekennzeichnete hypertrophe obstruktive oder nicht-obstruktive Kardiomyopathien und durch Hypertrophie und Dilatation des Herzens gekennzeichnete kongestive Kardiomyopathien (auch als dilatative kongestive Kardiomyopathien bezeichnet).

Den erfindungsgemäß bevorzugt behandelten Formen von Herzinsuffizienz, insbesondere kongestiver Herzinsuffizienz, liegen eine oder mehrere der nachfolgend aufgezählten Veränderungen des Myokards zugrunde: Hypertrophie einzelner oder aller Wandschichten, Abnahme der Muskeldehnbarkeit, Herzvergrößerung, insbesondere Ventrikelvergrößerung, insbesondere ohne Dickenzunahme der Ventrikelmuskulatur, Dickenabnahme der Ventrikelmuskulatur und fibrotische Veränderungen der Ventrikelmuskulatur.

Die erfindungsgemäß zu behandelnde Indikation Herzinsuffizienz ist in der Regel gekennzeichnet durch eine progressive Entwicklung, d. h. die vorstehend beschriebenen Zustände verändern sich im Laufe der Zeit, in der Regel nimmt der Schweregrad zu und gegebenenfalls können Zustände ineinander übergehen oder weitere Zustände zu bereits bestehenden Zuständen hinzutreten.

In diesem Sinne werden erfindungsgemäß insbesondere Veränderungen des Myokards behandelt, die unter dem Begriff "remodelling" zusammengefaßt werden; das sind Vorgänge, die Veränderungen in der Myokardiocyt-Struktur und/oder Veränderungen umgebenden Bindegewebes mit sich bringen.

Durch die erfindungsgemäße Behandlung von Herzinsuffizienz bzw. den ihr zugrundeliegenden Zuständen lassen sich eine Reihe weiterer Anzeichen, Symptome und/oder Fehlfunktionen behandeln, die mit Herzinsuffizienz zusammenhängen, d. h. insbesondere die oben beschriebenen Erkrankungszustände begleiten. Hierzu gehören beispielsweise Veränderungen des peripheren Kreislaufs, insbesondere Stauungserscheinungen im großen und/oder im kleinen Kreislauf, z. B. Lungen- und Leberkongestion, eine Verminderung der Blutversorgung der Kreislaufperipherie, Störungen der Atmung (Dyspnoe), der Nierenfunktion, z. B. Nykturie, und des Elektrolytstoffwechsels, z. B. periphere Ödeme, Brust- und Bauchwassersucht, etc. Diese Anzeichen, Symptome und/oder Fehlfunktionen bilden häufig Muster oder Gruppen, die als Syndrome bezeichnet werden, so daß sich erfindungsgemäß die Behandlung des Syndroms Herzinsuffizienz ergibt.

Eine Behandlung im erfindungsgemäßen Sinne umfaßt nicht nur die Behandlung akuter oder chronischer Anzeichen, Symptomen und/oder Fehlfunktionen, sondern auch eine vorbeugende Behandlung (Prävention).

Der Begriff "Heparanase-Inhibitor" beschreibt Substanzen, welche die enzymatische Aktivität von Heparanase oder deren Expression inhibieren. Unter Inhibition wird in diesem Zusammenhang eine Verminderung der Enzymaktivität, vor allem der Aktivität als Endoglycosidase, Endoglucuronidase, β -Glucuronidase und insbesondere Endo- β -Glucuronidase, bzw. der Expression von Heparanase verstanden. Die Enzymaktivität von Heparanase führt beispielsweise zur Spaltung von Glycosaminoglykanen, gegebenenfalls als Teil von Proteoglykanen, insbesondere von Heparansulfat, bzw. den entsprechenden Proteoglykanen. Vorzugsweise bewirken erfindungsgemäße Heparanase-Inhibitoren eine Verringerung des HS- und HSPG-Abbaus durch Heparanase.

Erfindungsgemäß bevorzugt sind Inhibitoren von Säuger-Heparanase (EC 3.2.1) und insbesondere von humaner Heparanase und vor allem der durch die cDNA mit der SEQ ID NO: 1 kodierte Heparanase mit der Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 2.

Erfindungsgemäße Inhibitoren binden in der Regel an Heparanase oder an Heparanase kodierende Nukleinsäuren, z. B. DNA oder mRNA. Unter Bindung versteht man jede molekulare Wechselwirkung zwischen Inhibitor und Enzym bzw. Nukleinsäure, insbesondere unter physiologischen Bedingungen. Dies sind in der Regel klassische Wechselwirkungen, zu denen elektrostatische Kräfte, van-der-Waals-Kräfte, Wasserstoffbrücken-Bindungen, hydrophobe Bindungen, oder metallkomplexartige koordinative Bindungen gehören. Zusätzlich zu den vorstehend genannten, reversiblen molekularen Wechselwirkungen können auch irreversible Wechselwirkungen zwischen Inhibitor und Enzym in Betracht kommen, z. B. kovalente Bindungen.

In der Regel binden Enzym-Inhibitoren im Bereich der oder einer der aktiven Domänen von Heparanase und konkurrieren mit anderen Substraten um deren Bindungsstelle(n) (Kompetition). Dementsprechend versteht man unter kompetitiven Enzym-Inhibitoren diejenigen, die mit einem Vergleichssubstrat, im vorliegenden Fall vorzugsweise Heparansulfat, um die Bindung an Heparanase konkurrieren, d. h. die Bindung des einen behindert die Bindung des anderen. Wegen dieser Bindung an Heparanase können kompetitive Enzym-Inhibitoren auch als Heparanase-Substrat bezeichnet werden. Vorzugsweise handelt es sich bei diesen Inhibitoren um Substrate, die im Vergleich zu dem oder den natürlichen Substraten der katalytischen Aktivität von Heparanase nicht oder zumindest weniger zugänglich sind, d. h. sie werden nicht oder in vergleichsweise geringem Ausmaß durch Heparanase umgesetzt, insbesondere gespalten. Ebenfalls brauchbar sind nicht-kompetitive Inhibitoren, die beispielsweise im wesentlichen irreversibel an aktive Domänen, oder an anderer Stelle an die Heparanase binden und, beispielsweise über allosterische Effekte, Einfluß auf die Enzymaktivität nehmen.

Zumindest für den Fall der kompetitiven Inhibition gilt der Grundsatz, daß die Verdrängung eines Substrats durch einen Inhibitor mit abnehmender Bindungsaffinität des Substrats bzw. zunehmender Bindungsaffinität des Inhibitors zunimmt. Zweckmäßigerweise besitzen daher erfindungsgemäß brauchbare Inhibitoren eine hohe Bindungsaffinität für Heparanase. Eine derartig günstig ausfallende Bindungsaffinität gestattet eine wirksame Verdrängung natürlich vorkommender Enzymsubstrate, beispielsweise von Heparansulfaten und Heparansulfat-Proteoglykanen, wobei die erforderliche Konzentration an Inhibitor zur Bindung einer bestimmten Menge dieses Inhibitors an das Enzym bzw. zur Verdrängung einer bestimmten Menge eines Substrats mit zunehmender Bindungsaffinität des Inhibitors abnimmt. Im Hinblick auf die medizinische Anwendung werden daher Inhibitoren bevorzugt, deren Bindungsaffinität so groß ist, daß diese als Wirkstoff im Rahmen einer wirksamen medizinischen Behandlung in vertretbaren Mengen verabreicht werden können. Erfindungsgemäße Inhibitoren werden daher vorzugsweise in Tagesdosen von etwa 0,01 bis 30 mg/kg Körpergewicht und insbesondere von etwa 0,1 bis 15 mg/kg Körpergewicht verabreicht.

Eine Möglichkeit, die Bindungsaffinität auszudrücken, bieten die oben angesprochenen Kompetitionsexperimente, mit denen man diejenige Konzentration an Inhibitor ermittelt, die das Enzym im Hinblick auf die Umsetzung eines anderen Substrats zu 50% hemmt (IC_{50} -Werte). So läßt sich auch die kompetitive Hemmung der Bindung von Heparanase-Inhibitoren dahingehend auswerten, daß erfindungsgemäß bevorzugte Inhibitoren halbmaximale Hemmkonstanten IC_{50} in vitro von weniger als 10^{-3} M, vorzugsweise von weniger als 10^{-4} M und insbesondere von weniger als 10^{-5} M und bei nicht-kompetitiver Hemmung von weniger als 10^{-4} M, vorzugsweise von weniger als 10^{-5} M und insbesondere von weniger als 10^{-6} M aufweisen.

Bei den Expressionsinhibitoren handelt es sich insbesondere um Oligonukleotide, die beispielsweise im Sinne einer

antisense-RNA oder -DNA, oder im Sinne der Triple-Helix-Technik wirken.

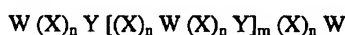
Eine Reihe von Heparanase-Inhibitoren sind bereits bekannt. Es handelt sich vielfach um Glycosaminoglykane mit struktureller Ähnlichkeit zu den natürlichen Substraten der Heparanase, insbesondere Heparansulfate. Hierzu gehören Heparine, Heparinfraktionen und Heparinfragmente, z. B. Heparine bestimmten Molekulargewichts, Heparinderivate, beispielsweise Heparine mit zumindest teilweise reduzierten Carboxylgruppen, zumindest partiell N-desulfatierte, N-acetylierte Heparine, z. B. in EP 0 254 067 A2, WO 92/01 003 und US-A-5,206,223 beschriebenes N-desulfatiertes, N-acetyliertes Heparin, zumindest partiell N,O-desulfatierte, N-resulfatierte Heparine, z. B. die in WO 92/01 003 und US-A-5,206,223 beschriebenen Verbindungen, und O-acylierte Heparine, beispielsweise die in der EP 0 356 275 A1 beschriebenen Verbindungen.

Heparin wird vorzugsweise aus natürlichen Quellen, beispielsweise der intestinalen Mukosa von Rindern oder Schweinen, gewonnen. Eine Fragmentierung und/oder Fraktionierung kann auf die übliche Art und Weise erfolgen. Carboxylgruppen lassen sich beispielsweise mit NaBH_4 reduzieren. Sulfatgruppen können beispielsweise durch eine Behandlung mit wasser- oder methanolhaltigem DMSO entfernt werden, wobei sich der Grad der Desulfatierung nach der Reaktionsdauer, der Reaktionstemperatur und dem Zusatz von Wasser oder Methanol richtet. Eine N-Acetylierung kann beispielsweise mit Essigsäureanhydrid unter alkalischen Bedingungen bewerkstelligt werden und die Resulfatierung gelingt beispielsweise mit einem Triethylamin-Schwefeltrioxid-Komplex.

Anstatt Heparin können auch andere Glycosaminoglykane derivatisiert werden, beispielsweise Hyaluronsäure, Chondroitin-4-sulfat, Chondroitin-6-sulfat, Dermatansulfat, Keratansulfat und Heparansulfat und deren Proteoglykane, wie am Beispiel der O-Acylierung in der EP 0 356 275 A1 beschrieben ist.

Geeignet sind auch sulfatierte Oligosaccharide, beispielsweise die in WO 96/33 726 beschriebenen, also insbesondere sulfatierte Mannopentasephosphate, Maltohexaosesulfate und dergleichen, und sulfatierte Polysaccharide, beispielsweise die in WO 88/05 301 beschriebenen, also insbesondere Heparin, Fucoidan, Pentosansulfat, Dextransulfat und Carrageenan-Lambda. Auch die in WO 90/01938 genannten Phosphozucker enthaltenden Oligo- und Polysaccharide sind brauchbar.

Ebenfalls geeignet sind glycomimetische Saccharopeptide, beispielsweise die in WO 96/35700 beschriebenen der Formel



worin die Reste W unabhängig voneinander für Fucose, 3-Amino-3-deoxyglucose, 4-Amino-4-deoxyglucose, Glucose, Galactose, Glucosamin, Galactosamin, Glucuronsäure, Galacturonsäure, Glucosaminuronsäure, Neuraminsäure, Maltose, Maltotriose, Iduronsäure, 2,5-Anhydromannitol, Mannose, Mannuronsäure, und Cellobiose stehen;

die Reste Y unabhängig voneinander für $-\text{NR}^3\text{-C}(\text{O})-$ und $-\text{C}(\text{O})\text{-NR}^3-$ stehen;

die Reste X unabhängig voneinander für eine difunktionelle oder polyfunktionelle Gruppe, insbesondere Ethylenglycol, Ethylenglycol-Oligomere, Niedrigalkyl, gegebenenfalls substituiertes Alkyl, Aminosäuren und Peptide stehen; n jeweils 0 oder 1 ist;

m jeweils 0 oder eine ganze Zahl von 1 bis 99 ist;

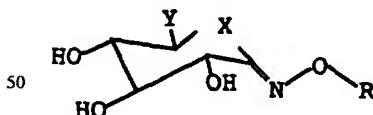
mit der Maßgabe, daß die Gesamtanzahl von Resten W 2 bis 100 beträgt;

und R^3 für -H, Alkyl mit 1 bis 8 Kohlenstoffatomen und Aralkyl mit 5 bis 8 Kohlenstoffatomen steht.

Laminarin-Sulfate, auch Laminaran-Sulfate genannt, das sind lineare Polymere aus β -1,3-verknüpften Glucose-Resten mit gegebenenfalls geringen Anteilen an β -(1,6)-Verknüpfungen und 2 bis 3% D-Mannitol-Endgruppen, insbesondere das Natriumsalz mit einem molaren Verhältnis von wenigstens 1 : 1 Sulfatgruppen zu Monosaccharid-Einheiten ist ebenfalls als Heparanase-Inhibitor brauchbar (vgl. WO 95/24 907).

Weitere Heparanase-Inhibitoren sind Suramin und Trachyspinaure.

Geeignet sind auch die in dem US-Patent 5,817,800 beschriebenen Verbindungen der Formel I



worin

Y für $-\text{COOH}$, $-\text{PO}_3\text{H}_2$, $-\text{P}(\text{O})(\text{OR}^6)(\text{OH})$, $-\text{P}(\text{O})\text{R}^6(\text{OH})$, Tetrazol oder $-\text{SO}_3\text{H}$ steht, worin

R^6 $\text{C}_1\text{-C}_4$ -Alkyl ist,

X für NH, O oder S steht, und

R für ein Wasserstoffatom oder für $-\text{C}(\text{O})\text{NHC}_6(\text{R}^7)_5$ steht, worin $\text{C}_6(\text{R}^7)_5$ vorzugsweise für gegebenenfalls einfach bis fünffach substituiertes Phenyl steht und die Substituenten R^7 ausgewählt sind unter OH, Halogen, $-\text{COOH}$, $-\text{PO}_3\text{H}_2$ oder $-\text{SO}_3\text{H}$.

Auch die Salze dieser Verbindungen gehören dazu. Veranschaulichende Beispiele dieser Verbindungen sind (Z)-O-(D-Glukopyranuronosylyden)amino-N-phenylcarbamate und (5R,Z)-O-(5-C-Phosphonato-D-xylopyranosylyden)amino-N-phenylcarbamate bzw. deren Natriumsalze. Diese Verbindungen können in an sich bekannter Weise hergestellt werden, beispielsweise mit den in der EP 0 642 799 beschriebenen Verfahren.

Niedermolekulare Heparanase-Inhibitoren, meist synthetische Verbindungen, sind in vielerlei Hinsicht vorteilhaft brauchbar.

Auch Aptamere, das sind Nukleinsäuren, in der Regel Oligonukleotide, mit ausreichender Affinität zu Heparanase, können als Inhibitoren Anwendung finden.

Auch Heparanase-spezifische Antikörper können als Heparanase-Inhibitoren brauchbar sein. Es kann sich um poly-

klonale Antisera, monoklonale Antikörper, Antikörperfragmente, wie F(ab), Fc, etc., chimäre und rekombinante Antikörper handeln. Die Herstellung solcher Antikörper kann in an sich bekannter Weise erfolgen. Als Immunogen kann man Heparanase als solche oder antigene Fragmente davon, die in der Regel an übliche Trägerproteine gekoppelt werden, verwenden. In Beispiel 8 der WO 99/43 830 wird beispielsweise die Herstellung eines polyklonalen Antiserums gegen ausgesuchte Peptide humaner Heparanase beschrieben. In ähnlicher Weise wird in WO 95/04 158 die Herstellung ausgesuchter Heparanase-Peptide, insbesondere einer C-terminalen Sequenz, dort SEQ ID NO: 42 genannt, und die Erzeugung hiergegen gerichteter Antisera sowie deren Brauchbarkeit als Heparanase-Inhibitoren beschrieben.

Die WO 96/08 559 beschreibt Phosphorothioat- oder Phosphordithioat-Antisense-Oligonukleotide mit vorzugsweise 7 bis 30 Nukleotiden, die im wesentlichen aus dG und/oder dT-Nukleotiden gebildet werden. Konkret eignen sich zur Inhibition von Endoglycosidasen, insbesondere Heparanasen, beispielsweise die Oligonukleotide der dort beschriebenen Sequenzen SEQ ID NO: 2, 4, 6, 10.

Die erfindungsgemäße Anwendung ist nicht auf die vorstehend genannten Inhibitoren beschränkt. Vielmehr kann jede Substanz, in deren Gegenwart die Heparanase-Aktivität geringer ist als in deren Abwesenheit, erfindungsgemäß als Heparanase-Inhibitor Anwendung finden.

Zur Messung der Heparanase-Aktivität sind Testsysteme bekannt. Diese beruhen in der Regel auf dem Einsatz von markierten Heparansulfaten oder Heparansulfat-Proteoglykanen als Substrat, wobei die Umsetzung, d. h. die Spaltung dieses Substrats und die damit verbundene Freisetzung bestimmter Fragmente anhand der Markierung verfolgt werden kann. Beispielsweise kann man fluoreszenz-, z. B. FITC-, oder radio-, z. B. $^{35}\text{SO}_4$ -, ^{14}C - oder ^3H -markierte Heparansulfate oder Heparansulfat-Proteoglykane, insbesondere $^{35}\text{SO}_4$ -markierte Heparansulfat-Proteoglykane, ^{14}C - oder ^3H -acetylierte Heparansulfate, oder fluoreszenzmarkierte Substrate, beispielsweise 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid verwenden.

Die Substrate können auf biologischem Wege erhalten werden, beispielsweise indem man Endothelialzellen in radio-markiertem $^{35}\text{SO}_4$ kultiviert oder tumorösen Versuchstieren radiomarkiertes Sulfat injiziert, und aus den Endothelial- bzw. Tumorzellen entsprechend markierte Heparansulfat-Proteoglykane gewinnt. Die Substrate können aber auch auf chemischem Wege synthetisiert werden, beispielsweise indem man Heparansulfat zunächst partiell deacetyliert und anschließend reacctyliert. Durch reduktive Aminierung der freien Enden von Heparansulfat und anschließender Anfügung geeigneter Markierungen können beispielsweise fluoreszenzmarkierte Heparansulfate hergestellt werden. Es kann von Vorteil sein, solche Substrate an einen festen Träger zu koppeln, was den Nachweis freigesetzter Fragmente erleichtert. Zu diesem Zweck kann man die in diesem Bereich übliche Kopplungschemie anwenden, beispielsweise zunächst die reduzierenden Enden aminieren und dann derart modifizierte Glycosaminoglykane an geeignete Matrices, beispielsweise Agarose, Sepharose und ähnliches koppeln. Heparansulfat-Proteoglykane oder auch Heparansulfat-Peptide davon können beispielsweise an CNBr-aktivierter Sepharose gekoppelt werden. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Abtrennung der Degradationsprodukte durch Gelfiltration, Fällungsreaktionen, z. B. wie in Beispiel J der WO 96/35 700 beschrieben ist, und ähnlichem. Mittels HPLC, vorzugsweise der Ausschluß-HPLC, lassen sich vorteilhafterweise Fluoreszenzmarkierungen detektieren. Gemäß dem in der WO 98/03 638 beschriebenen Testverfahren kann man auch HSbindende Proteine, z. B. histidinreiche Glycoproteine, vorzugsweise in immobilisierter Form verwenden, um nicht oder nur partiell degradiertes Heparanase-Substrat von degradiertem Substrat zu trennen und dadurch dessen Nachweis zu ermöglichen.

Die in diesen Tests eingesetzte Heparanase kann natürlichen oder rekombinanten Ursprungs sein, so kann Heparanase aus einer Vielzahl von Geweben und Körperflüssigkeiten, Serum eingeschlossen, aufgereinigt werden. Die Expression menschlicher Heparanase kann mit den in WO 95/04 158 und WO 99/43 830 erwähnten Expressionssystemen bewerkstelligt werden.

Die vorstehend beschriebenen und weitere in ähnlicher Weise geeignete Testsysteme können die Grundlage bilden für in vitro-Screening-Verfahren, vorzugsweise zum primären Screening, mit denen man aus einer Vielzahl verschiedener Substanzen diejenigen auslesen kann, die im Hinblick auf die erfindungsgemäße Anwendung brauchbar sind. Beispielsweise können mittels kombinatorischer Chemie umfangreiche Stoffbanken angelegt werden, die Myriaden potentieller Wirkstoffe umfassen. Das Durchmuster kombinatorischer Substanzbibliotheken nach Stoffen mit gewünschter Aktivität ist automatisierbar. Screening-Roboter dienen der effizienten Auswertung der vorzugsweise auf Mikrotiterplatten angeordneten Einzelassays.

Eine besonders effektive Technologie zur Durchführung derartiger Verfahren ist der im Bereich des Wirkstoffscreenings bekannte Scintillation Proximity Assay, kurz SPA genannt. Kits und Komponenten zur Durchführung dieses Assays können kommerziell bezogen werden, beispielsweise bei Amersham Pharmacia Biotech. Für enzymatische Testanwendungen werden im Prinzip solubilisierbare oder membrangebundene Substrate auf Scintillationssubstanz enthaltenden, kleinen Fluoromikrosphären immobilisiert. Je nach Art der zu testenden enzymatischen Aktivität ist das Substrat radioaktiv markiert und die Scintillationssubstanz wird solange zur Lichtemission angeregt, wie die räumliche Nähe zwischen Scintillationssubstanz und Radiomarkierung gegeben ist, oder es wird die radioaktive Markierung in das immobilisierte Substrat eben durch die zu messende Enzymaktivität eingefügt und als Folge die Scintillationssubstanz wird solange zur Lichtemission angeregt. So ergeben sich Testformate, bei denen eine abnehmende bzw. zunehmende Signalintensität gemessen wird.

Eine weitere besonders effektive Technologie zur Durchführung derartiger Verfahren ist die im Bereich des Wirkstoffscreenings bekannte FlashPlate®-Technologie. Kits und Komponenten zur Durchführung dieses Assays können kommerziell bezogen werden, beispielsweise bei NEN® Life Science Products. Dieses Prinzip basiert ebenfalls auf Mikrotiterplatten (96er oder 384er), die mit Scintillationssubstanz beschichtet sind.

Die erfindungsgemäße Verwendung von Heparanase-Inhibitoren beinhaltet im Rahmen der Behandlung ein Verfahren. Dabei wird dem zu behandelnden Individuum, vorzugsweise einem Säuger, insbesondere einem Menschen, Nutz- oder Haustier, eine wirksame Menge eines oder mehrerer Heparanase-Inhibitoren, in der Regel der pharmazeutischen und tierarzneilichen Praxis entsprechend formuliert, verabreicht. Ob eine solche Behandlung angezeigt ist und in welcher Form sie zu erfolgen hat, hängt vom Einzelfall ab und unterliegt einer medizinischen Beurteilung (Diagnose), die vor-

handene Anzeichen, Symptome und/oder Fehlfunktionen, Risiken, bestimmte Anzeichen, Symptome und/oder Fehlfunktionen zu entwickeln, und weitere Faktoren miteinbezieht.

Die erfindungsgemäße Lehre richtet sich vor allem auf die Herstellung pharmazeutischer Mittel zur Behandlung eines Individuums, vorzugsweise eines Säugers, insbesondere eines Menschen, Nutz- oder Haustieres. So werden die Inhibitoren gewöhnlich in Form von pharmazeutischen Zusammensetzungen verabreicht, die einen pharmazeutisch verträglichen Exzipienten mit wenigstens einem erfindungsgemäßen Inhibitor, gegebenenfalls auch einem Gemisch mehrerer erfindungsgemäßer Inhibitoren, und gegebenenfalls weiteren Wirkstoffen umfassen. Diese Zusammensetzungen können beispielsweise auf oralem, rektalem, transdermale, subkutanem, intravenösem, intramuskulärem oder intranasalem Weg verabreicht werden.

Beispiele geeigneter pharmazeutischer Formulierungen sind feste Arzneiformen, wie Pulver, Puder, Granulate, Tabletten, Pastillen, Sachets, Cachets, Dragees, Kapseln wie Hart- und Weichgelatinekapseln, Suppositorien oder vaginale Arzneiformen, halbfeste Arzneiformen, wie Salben, Cremes, Hydrogele, Pasten oder Pflaster, sowie flüssige Arzneiformen, wie Lösungen, Emulsionen, insbesondere Öl-in-Wasser-Emulsionen, Suspensionen, beispielsweise Lotionen, Injektions- und Infusionszubereitungen, Augen- und Ohrentropfen. Auch implantierte Abgabevorrichtungen können zur Verabreichung erfindungsgemäßer Inhibitoren verwendet werden. Ferner können auch Liposomen, Mikrosphären oder Polymermatrizes zur Anwendung kommen.

Bei der Herstellung der Zusammensetzungen werden erfindungsgemäße Inhibitoren gewöhnlich mit einem Exzipienten vermischt oder verdünnt. Exzipienten können feste, halbfeste oder flüssige Materialien sein, die als Vehikel, Träger oder Medium für den Wirkstoff dienen.

Zu geeigneten Exzipienten gehören beispielsweise Lactose, Dextrose, Sucrose, Sorbitol, Manitol, Stärken, Akazien-gummi, Calciumphosphat, Alginate, Traganth, Gelantine, Calciumsilikat, mikrokristalline Cellulose, Polyvinylpyrrolidon, Cellulose, Wasser, Sirup und Methylcellulose. Ferner können die Formulierungen pharmazeutisch akzeptable Träger oder übliche Hilfsstoffe, wie Gleitmittel, beispielsweise Talg, Magnesiumstearat und Mineralöl; Netzmittel; emulgierende und suspendierende Mittel; konservierende Mittel, wie Methyl- und Propylhydroxybenzoate; Antioxidantien; Antireizstoffe; Chelatbildner; Dragierhilfsmittel; Emulsionsstabilisatoren Filmbildner; Gelbildner; Geruchsmaskierungsmittel; Geschmackskorrigentien; Harze; Hydrokolloide; Lösemittel; Lösungsvermittler; Neutralisierungsmittel; Permeationsbeschleuniger; Pigmente; quaternäre Ammoniumverbindungen; Rückfettungs- und Überfettungsmittel; Salben-, Creme- oder Öl-Grundstoffe; Silikon-Derivate; Spreithilfsmittel; Stabilisatoren; Sterilanzien; Suppositoriengrundlagen; Tabletten-Hilfsstoffe, wie Bindemittel, Füllstoffe, Gleitmittel, Sprengmittel oder Überzüge; Treibmittel; Trocknungsmittel; Trübungsmittel; Verdickungsmittel; Wachse; Weichmacher; Weißöle umfassen. Eine diesbezügliche Ausgestaltung beruht auf fachmännischem Wissen, wie beispielsweise in Fiedler, H. P., Lexikon der Hilfsstoffe für Pharmazie, Kosmetik und angrenzende Gebiete, 4. Auflage, Aulendorf: ECV-Editio-Kantor-Verlag, 1996, dargestellt ist.

Die vorliegende Erfindung wird anhand der nachfolgenden Beispiele näher erläutert, ohne darauf beschränkt zu sein.

Fig. 1 zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung der nach RT-PCR gemäß Beispiel 1 erhaltenen Amplifikate parallel zu Molekulargewichtsstandards (MWM) und der Negativ-Kontrolle (negativ).

Beispiel 1

Heparanase-Expression in einem Ratten-Modell für kongestive Herzinsuffizienz

Das verwendete Tier-Modell wurde von Wiesener et al. in Circulation 95, 1253-1259 (1997) beschrieben. So entwickelten fünf mit der Aortenklammtechnik behandelte Ratten (Nr. 3, 15, 24, 25, 112) eine kongestive Herzinsuffizienz (Herzhypertrophie). Die Herzen wurden entnommen, und die mRNA wurde in üblicher Weise isoliert. Mittels RT-PCR konnte die Menge an exprimierter Heparanase-mRNA bestimmt werden, indem man als Sense-Primer das Oligonukleotid mit der Sequenz SEQ ID NO: 3 und als Antisense-Primer das Oligonukleotid mit der Sequenz SEQ ID NO: 4 verwendete. Parallel wurde die GAPDH-Expression als Housekeeping-Gen gemessen. Die gleiche Untersuchung wurde an Kontrolltieren (Ratten Nr. 11, 17, 19, 32, 33) vorgenommen.

Die jeweiligen mittels RT-PCR erhaltenen Amplifikate wurden elektrophoretisch aufgetrennt, und ihre Menge wurde quantifiziert. Fig. 1 zeigt für die Tiere 11, 17, 19, 32 und 33 der Kontrollgruppe sowie die Tiere 3, 15, 24, 25 und 112 der Testgruppe die erhaltenen Amplifikate nach elektrophoretischer Auftrennung. Die Quantifizierung ergab folgende, jeweils auf die GAPDH-Expression bezogene Heparanase-mRNA-Spiegel:

Tabelle 1

	Tier Nr.	mRNA-Expression
Kontrollgruppe	11	5,117
	17	5,077
	19	4,65
	32	3,812
	33	3,474
Testgruppe	3	4,205
	15	4,223
	24	4,14
	25	4,102
	112	4,093

Als Mittelwerte ergeben sich für die Kontrollgruppe $4,289 \pm 0,75$ und für die Testgruppe $4,153 \pm 0,06$. Diese Werte zeigen, daß der im Modell induzierte pathologische Zustand nicht mit einer Regulation der Expression von Heparanase-mRNA verbunden ist, sondern die im Zusammenhang mit Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz auftretende intra- und extrazelluläre Ansäuerung die Heparanase-Aktivität moduliert (Schini-Kerth et al (1997) Circulation 96, 3888–3896; Shrode et al. (1997) J Bioenerg Biomembr 29, 393–399; Kraus and Wolf (1996) Tumor Biol 17, 133–154; Tamagaki et al. (1996) Atherosclerosis 123, 73–82; Brown and Breton (1996) J Exp Biol. 199, 2345–2358; Apkon et al. (1997) Am J Physiol 273, H434–445; Ito et al (1997) J. Clin Invest 99, 125–135; Tajima et al. (1998) Circulation 98, 2760–2764; Flores et al (1996) Kidney Int. Suppl 55, S. 122–125; Hisatome et al. (1997) Gen Pharmacol 29, 557–560; Russ et al. (1996) Pflugers Arch 433, 26–34).

DE 199 55 803 A 1

SEQUENCE LISTING

<110> Knoll AG

5 <120> USE OF HEPARANASE INHIBITORS FOR THE TREATMENT OF
HEART FAILURE

<130> M/40261

10

<140>

<141>

15

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

20

<210> 1

<211> 1724

<212> DNA

<213> Homo sapiens

25

<220>

<221> CDS

<222> (52)..(1683)

30

<400> 1

aggcgggccg ctgcgcggca gctggcgggg gagcagccag gtgagcccaa g atg ctg 57
Met Leu
1

35

ctg cgc tcg aag cct gcg ctg ccg ccg ccg ctg atg ctg ctg ctc ctg 105
Leu Arg Ser Lys Pro Ala Leu Pro Pro Pro Leu Met Leu Leu Leu
5 10 15

40

ggg ccg ctg ggt ccc ctc tcc cct ggt gcc ctg ccc cga cct gcg caa 153
Gly Pro Leu Gly Pro Leu Ser Pro Gly Ala Leu Pro Arg Pro Ala Gln
20 25 30

45

gca cag gac gtc gtg gac ctg gac ttc ttc acc cag gag ccg ctg cac 201
Ala Gln Asp Val Val Asp Leu Asp Phe Phe Thr Gln Glu Pro Leu His
35 40 45 50

50

ctg gtg agc ccc tcg ttc ctg tcc gtc acc att gac gcc aac ctg gcc 249
Leu Val Ser Pro Ser Phe Leu Ser Val Thr Ile Asp Ala Asn Leu Ala
55 60 65

55

acg gac ccg cgg ttc ctc atc ctc ctg ggt tct cca aag ctt cgt acc 297
Thr Asp Pro Arg Phe Leu Ile Leu Leu Gly Ser Pro Lys Leu Arg Thr
70 75 80

60

65

DE 199 55 803 A 1

ttg gcc aga ggc ttg tct cct gcg tac ctg agg ttt ggt ggc acc aag	345	
Leu Ala Arg Gly Leu Ser Pro Ala Tyr Leu Arg Phe Gly Gly Thr Lys		
85 90 95		
aca gac ttc cta att ttc gat ccc aag aag gaa tca acc ttt gaa gag	393	5
Thr Asp Phe Leu Ile Phe Asp Pro Lys Lys Glu Ser Thr Phe Glu Glu		
100 105 110		
aga agt tac tgg caa tct caa gtc aac cag gat att tgc aaa tat gga	441	10
Arg Ser Tyr Trp Gln Ser Gln Val Asn Gln Asp Ile Cys Lys Tyr Gly		
115 120 125 130		
tcc atc cct cct gat gtg gag gag aag tta cgg ttg gaa tgg ccc tac	489	15
Ser Ile Pro Pro Asp Val Glu Glu Lys Leu Arg Leu Glu Trp Pro Tyr		
135 140 145		
cag gag caa ttg cta ctc cga gaa cac tac cag aaa aag ttc aag aac	537	20
Gln Glu Gln Leu Leu Leu Arg Glu His Tyr Gln Lys Lys Phe Lys Asn		
150 155 160		
agc acc tac tca aga agc tct gta gat gtg cta tac act ttt gca aac	585	25
Ser Thr Tyr Ser Arg Ser Ser Val Asp Val Leu Tyr Thr Phe Ala Asn		
165 170 175		
tgc tca gga ctg gac ttg atc ttt ggc cta aat gcg tta tta aga aca	633	30
Cys Ser Gly Leu Asp Leu Ile Phe Gly Leu Asn Ala Leu Leu Arg Thr		
180 185 190		
gca gat ttg cag tgg aac agt tct aat gct cag ttg ctc ctg gac tac	681	35
Ala Asp Leu Gln Trp Asn Ser Ser Asn Ala Gln Leu Leu Leu Asp Tyr		
195 200 205 210		
tgc tct tcc aag ggg tat aac att tct tgg gaa cta ggc aat gaa cct	729	40
Cys Ser Ser Lys Gly Tyr Asn Ile Ser Trp Glu Leu Gly Asn Glu Pro		
215 220 225		
aac agt ttc ctt aag aag gct gat att ttc atc aat ggg tgc cag tta	777	45
Asn Ser Phe Leu Lys Lys Ala Asp Ile Phe Ile Asn Gly Ser Gln Leu		
230 235 240		
gga gaa gat ttt att caa ttg cat aaa ctt cta aga aag tcc acc ttc	825	50
Gly Glu Asp Phe Ile Gln Leu His Lys Leu Leu Arg Lys Ser Thr Phe		
245 250 255		
aaa aat gca aaa ctc tat ggt cct gat gtt ggt cag cct cga aga aag	873	55
Lys Asn Ala Lys Leu Tyr Gly Pro Asp Val Gly Gln Pro Arg Arg Lys		
260 265 270		
acg gct aag atg ctg aag agc ttc ctg aag gct ggt gga gaa gtg att	921	60
Thr Ala Lys Met Leu Lys Ser Phe Leu Lys Ala Gly Gly Glu Val Ile		
275 280 285 290		

65

DE 199 55 803 A 1

	gat tca gtt aca tgg cat cac tac tat ttg aat gga cgg act gct acc	969
	Asp Ser Val Thr Trp His His Tyr Tyr Leu Asn Gly Arg Thr Ala Thr	
	295 300 305	
5		
	agg gaa gat ttt cta aac cct gat gta ttg gac att ttt att tca tct	1017
	Arg Glu Asp Phe Leu Asn Pro Asp Val Leu Asp Ile Phe Ile Ser Ser	
	310 315 320	
10		
	gtg caa aaa gtt ttc cag gtg gtt gag agc acc agg cct ggc aag aag	1065
	Val Gln Lys Val Phe Gln Val Val Glu Ser Thr Arg Pro Gly Lys Lys	
	325 330 335	
15		
	gtc tgg tta gga gaa aca agc tct gca tat gga ggc gga gcg ccc ttg	1113
	Val Trp Leu Gly Glu Thr Ser Ser Ala Tyr Gly Gly Gly Ala Pro Leu	
	340 345 350	
20		
	cta tcc gac acc ttt gca gct ggc ttt atg tgg ctg gat aaa ttg ggc	1161
	Leu Ser Asp Thr Phe Ala Ala Gly Phe Met Trp Leu Asp Lys Leu Gly	
	355 360 365 370	
25		
	ctg tca gcc cga atg gga ata gaa gtg gtg atg agg caa gta ttc ttt	1209
	Leu Ser Ala Arg Met Gly Ile Glu Val Val Met Arg Gln Val Phe Phe	
	375 380 385	
30		
	gga gca gga aac tac cat tta gtg gat gaa aac ttc gat cct tta cct	1257
	Gly Ala Gly Asn Tyr His Leu Val Asp Glu Asn Phe Asp Pro Leu Pro	
	390 395 400	
35		
	gat tat tgg cta tct ctt ctg ttc aag aaa ttg gtg ggc acc aag gtg	1305
	Asp Tyr Trp Leu Ser Leu Leu Phe Lys Lys Leu Val Gly Thr Lys Val	
	405 410 415	
40		
	tta atg gca agc gtg caa ggt tca aag aga agg aag ctt cga gta tac	1353
	Leu Met Ala Ser Val Gln Gly Ser Lys Arg Arg Lys Leu Arg Val Tyr	
	420 425 430	
45		
	ctt cat tgc aca aac act gac aat cca agg tat aaa gaa gga gat tta	1401
	Leu His Cys Thr Asn Thr Asp Asn Pro Arg Tyr Lys Glu Gly Asp Leu	
	435 440 445 450	
50		
	act ctg tat gcc ata aac ctc cat aat gtc acc aag tac ttg cgg tta	1449
	Thr Leu Tyr Ala Ile Asn Leu His Asn Val Thr Lys Tyr Leu Arg Leu	
	455 460 465	
55		
	ccc tat cct ttt tct aac aag caa gtg gat aaa tac ctt cta aga cct	1497
	Pro Tyr Pro Phe Ser Asn Lys Gln Val Asp Lys Tyr Leu Leu Arg Pro	
	470 475 480	
60		
	ttg gga cct cat gga tta ctt tcc aaa tct gtc caa ctc aat ggt cta	1545
	Leu Gly Pro His Gly Leu Leu Ser Lys Ser Val Gln Leu Asn Gly Leu	
	485 490 495	

65

DE 199 55 803 A 1

act cta aag atg gtg gat gat caa acc ttg cca cct tta atg gaa aaa	1593
Thr Leu Lys Met Val Asp Asp Gln Thr Leu Pro Pro Leu Met Glu Lys	
500 505 510	
5	
cct ctc cgg cca gga agt tca ctg ggc ttg cca gct ttc tca tat agt	1641
Pro Leu Arg Pro Gly Ser Ser Leu Gly Leu Pro Ala Phe Ser Tyr Ser	
515 520 525 530	
10	
ttt ttt gtg ata aga aat gcc aaa gtt gct gct tgc atc tga	1683
Phe Phe Val Ile Arg Asn Ala Lys Val Ala Ala Cys Ile	
535 540	
15	
aaataaaata tactagtcct gaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a	1724
20	
<210> 2	
<211> 543	
<212> PRT	
<213> Homo sapiens	
25	
<400> 2	
Met Leu Leu Arg Ser Lys Pro Ala Leu Pro Pro Pro Leu Met Leu Leu	
1 5 10 15	
30	
Leu Leu Gly Pro Leu Gly Pro Leu Ser Pro Gly Ala Leu Pro Arg Pro	
20 25 30	
35	
Ala Gln Ala Gln Asp Val Val Asp Leu Asp Phe Phe Thr Gln Glu Pro	
35 40 45	
40	
Leu His Leu Val Ser Pro Ser Phe Leu Ser Val Thr Ile Asp Ala Asn	
50 55 60	
45	
Leu Ala Thr Asp Pro Arg Phe Leu Ile Leu Leu Gly Ser Pro Lys Leu	
65 70 75 80	
50	
Arg Thr Leu Ala Arg Gly Leu Ser Pro Ala Tyr Leu Arg Phe Gly Gly	
85 90 95	
55	
Thr Lys Thr Asp Phe Leu Ile Phe Asp Pro Lys Lys Glu Ser Thr Phe	
100 105 110	
60	
Glu Glu Arg Ser Tyr Trp Gln Ser Gln Val Asn Gln Asp Ile Cys Lys	
115 120 125	
65	
Tyr Gly Ser Ile Pro Pro Asp Val Glu Glu Lys Leu Arg Leu Glu Trp	
130 135 140	
70	
Pro Tyr Gln Glu Gln Leu Leu Leu Arg Glu His Tyr Gln Lys Lys Phe	
145 150 155 160	
75	
Lys Asn Ser Thr Tyr Ser Arg Ser Ser Val Asp Val Leu Tyr Thr Phe	
165 170 175	
80	

DE 199 55 803 A 1

Ala Asn Cys Ser Gly Leu Asp Leu Ile Phe Gly Leu Asn Ala Leu Leu
180 185 190

5 Arg Thr Ala Asp Leu Gln Trp Asn Ser Ser Asn Ala Gln Leu Leu Leu
195 200 205

10 Asp Tyr Cys Ser Ser Lys Gly Tyr Asn Ile Ser Trp Glu Leu Gly Asn
210 215 220

Glu Pro Asn Ser Phe Leu Lys Lys Ala Asp Ile Phe Ile Asn Gly Ser
225 230 235 240

15 Gln Leu Gly Glu Asp Phe Ile Gln Leu His Lys Leu Leu Arg Lys Ser
245 250 255

20 Thr Phe Lys Asn Ala Lys Leu Tyr Gly Pro Asp Val Gly Gln Pro Arg
260 265 270

Arg Lys Thr Ala Lys Met Leu Lys Ser Phe Leu Lys Ala Gly Gly Glu
275 280 285

25 Val Ile Asp Ser Val Thr Trp His His Tyr Tyr Leu Asn Gly Arg Thr
290 295 300

30 Ala Thr Arg Glu Asp Phe Leu Asn Pro Asp Val Leu Asp Ile Phe Ile
305 310 315 320

Ser Ser Val Gln Lys Val Phe Gln Val Val Glu Ser Thr Arg Pro Gly
325 330 335

Lys Lys Val Trp Leu Gly Glu Thr Ser Ser Ala Tyr Gly Gly Gly Ala
340 345 350

40 Pro Leu Leu Ser Asp Thr Phe Ala Ala Gly Phe Met Trp Leu Asp Lys
355 360 365

45 Leu Gly Leu Ser Ala Arg Met Gly Ile Glu Val Val Met Arg Gln Val
370 375 380

Phe Phe Gly Ala Gly Asn Tyr His Leu Val Asp Glu Asn Phe Asp Pro
385 390 395 400

50 Leu Pro Asp Tyr Trp Leu Ser Leu Leu Phe Lys Lys Leu Val Gly Thr
405 410 415

55 Lys Val Leu Met Ala Ser Val Gln Gly Ser Lys Arg Arg Lys Leu Arg
420 425 430

Val Tyr Leu His Cys Thr Asn Thr Asp Asn Pro Arg Tyr Lys Glu Gly
435 440 445

60 Asp Leu Thr Leu Tyr Ala Ile Asn Leu His Asn Val Thr Lys Tyr Leu
450 455 460

65

DE 199 55 803 A 1

Arg Leu Pro Tyr Pro Phe Ser Asn Lys Gln Val Asp Lys Tyr Leu Leu	465	470	475	480	
Arg Pro Leu Gly Pro His Gly Leu Leu Ser Lys Ser Val Gln Leu Asn	485	490	495		5
Gly Leu Thr Leu Lys Met Val Asp Asp Gln Thr Leu Pro Pro Leu Met	500	505	510		10
Glu Lys Pro Leu Arg Pro Gly Ser Ser Leu Gly Leu Pro Ala Phe Ser	515	520	525		
Tyr Ser Phe Phe Val Ile Arg Asn Ala Lys Val Ala Ala Cys Ile	530	535	540		15
<210> 3					20
<211> 24					
<212> DNA					
<213> Artificial Sequence					25
<220>					
<223> Description of Artificial Sequence:Oligonucleotide useful as sense primer for the amplification of human heparanase cDNA					30
<400> 3					
cctgaaggct ggtggagaag tgat					24 35
<210> 4					40
<211> 24					
<212> DNA					
<213> Artificial Sequence					
<220>					45
<223> Description of Artificial Sequence:Oligonucleotide useful as antisense primer for the amplification of human heparanase cDNA					50
<400> 4					
gccagctgca aaggtgtcgg atag					24

Patentansprüche

1. Verwendung wenigstens eines Heparanase-Inhibitors zur Behandlung von Herzinsuffizienz und damit zusammenhängenden Anzeichen, Symptomen und/oder Fehlfunktionen.
2. Verwendung nach Anspruch 1 zur Behandlung von kongestiver Herzinsuffizienz und damit zusammenhängenden Anzeichen, Symptomen und/oder Fehlfunktionen.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2 zur Behandlung von peripheren Ödemen, Lungen- und Leberkongestion, Dyspnoe, Brust- und Bauchwassersucht.
4. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei wenigstens ein Heparanase-Inhibitor ein Glycosaminoglykan ist.
5. Verwendung nach Anspruch 4, wobei das Glycosaminoglykan ausgewählt ist unter Heparinen mit zumindest teilweise reduzierten Carboxylgruppen, zumindest partiell N-desulfatierten, N-acetylierten Heparinen, zumindest partiell N,O-desulfatierten, N-resulfatierten Heparinen, O-acylierten Heparinen, sulfatierten und/oder phosphory-

DE 199 55 803 A 1

lierten Oligosacchariden, glycomimetischen Saccharopeptiden, Laminarin-Sulfaten, Suramin und Trachypinsäure.
6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei wenigstens ein Heparanase-Inhibitor eine niedermolekulare Verbindung ist.

5

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

10

15

20

25

30

35

40

45

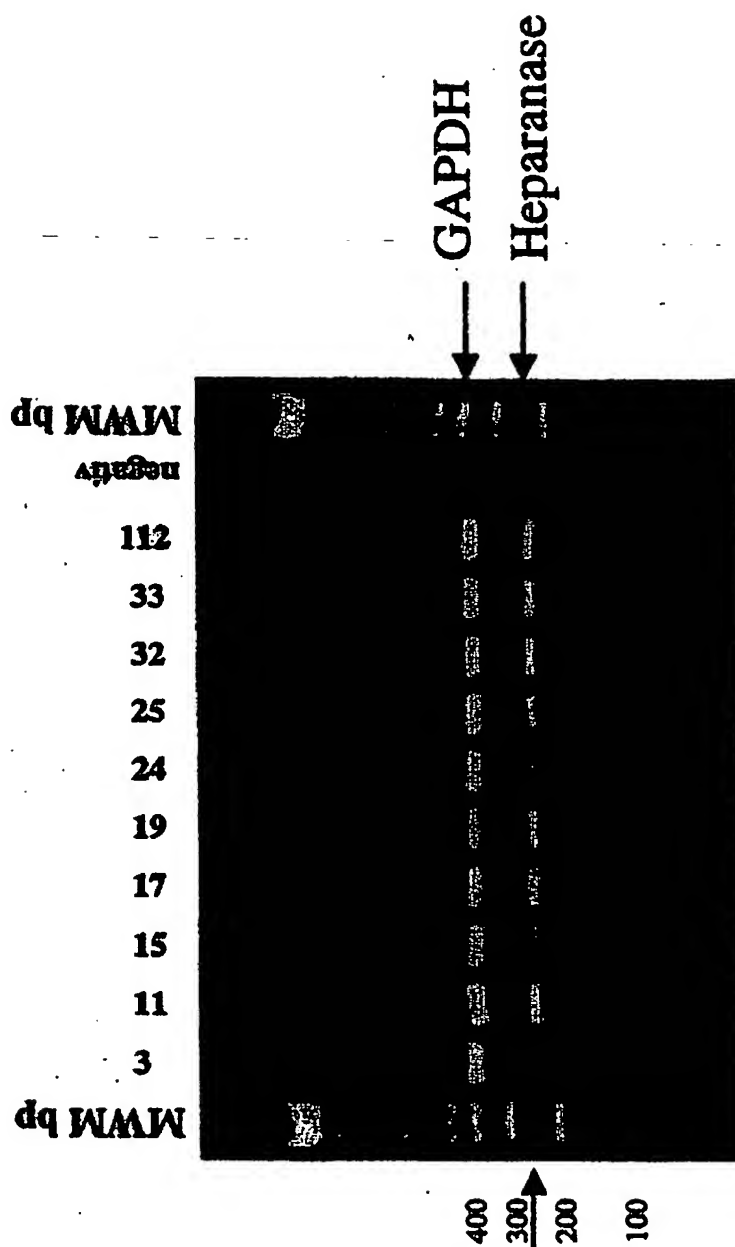
50

55

60

65

- Leerseite -



FIGUR 1

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.